Chinese Agron. J. 1: 101-113 (1991)
Chinese Society of Agronomy © 1991

玉米未成熟胚培養 (一)影響癒合組織形成因子之研究

廖成康[1] 蔡新聲[2]

[1]國立台灣大學農藝系 [2]台灣省農業試驗所農藝系

摘要：組織培養技術，應用於作物品種改良，其前題是必須能獲得大量之再生植株，因此建立一套具有高分化能力的培養系統有其必要，其中作物的基因型、培植體來源、年齡及培養條件爲成功與否的重要因素。本試驗以玉米未成熟胚爲培植體，探討影響癒合組織形成的因子。結果得知以授粉後十天，大小約1mm之未成熟胚，癒合組織誘導率最佳。接種時，胚擺放的角度以子葉盤朝上，胚軸與培養基接觸，較適合癒合組織的形成。MN－6基本培養基中加入植物生長調節劑 dicamba (3, 6－dichloroanisic acid)或2, 4－D (2, 4－dichlorophenoxyacetic acid)，對於癒合組織形成的效果較 NAA (α－naphthaleneacetic acid), 2, 4,5－T (2, 4, 5－trichlorophenoxyacetic acid)佳，其中3 mg/1 dicamba 或1 mg/1 2, 4－D 較適宜。3至9%的蔗糖濃度對癒合組織之誘導無顯著影響，12%之蔗糖則較不利於癒合組織之誘導。低氮素濃度培養基(MN－6基本培養基所含氮量之1/4, 1/8及1/16X)所誘導之癒合組織，外形呈粘稠半透明狀，有類似 non－embryogenic callus 之構造；高氮素濃度(1/2及1X)培養基所誘導之癒合組織，質地較爲緊密，且多呈 embryogenic callus 之外觀，較有利於未來植株之分化。

關鍵語：玉米、未成熟胚培養、2, 4－D、dicamba。

Immature embryo culture of *Zea mays* L. I. Factors affecting the callus induction

C. K. Liao[1] and H. S. Tsay[2]

[1]Department of Agronomy, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, Republic of China and [2]Department of Agronomy, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, Republic of China

Abstract. The application of tissue culture technologies on crop improvement depends on the production of a large number of regenerated

plants. To meet such purpose, it is important to develop a system which enables the cultured explants to show a high differentiation ability. Among the many factors involved, plant genotype and plant explant part to be cultured, medium composition and cultural conditions are considered essential in establishing a successful tissue culture system for any plant species. In this paper, factors affecting the induction of callus from immature maize embryos were studied. The optimum embryo age and size for callus induction were 10 days after pollination and about 1 mm in length, respectively. Immature embryo cultured with the embryo axis in contact with the culture medium showed the highest frequency of callus induction as compared to other positions of culture. Plant growth regulators dicamba and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) supplemented to MN-6 basal medium were more effective in inducing callus formation than α-naphthaleneacetic acid (NAA) and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T). Optimum concentration of dicamba and 2,4-D were, respectively, 3 and 1 mg/l. Concentrations of sucrose in the range of 3 to 9% showed no difference in their effect on callus induction. Callus induced from lower concentrations of nitrogen containing medium (1/4, 1/8 and 1/16 of the total nitrogen content in MN-6 basal medium) showed transparent and sticky appearance which looks like non-embryogenic callus. In contrast, callus produced from higher concentrations of nitrogen containing medium (1/2 and whole rate of nitrogen content in MN-6 basal medium) possessed higher regeneration ability due to their embryogenic callus appearance and compact structure.

Key words: *Zea mays*, immature embryo culture, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, dicamba.

前　言

利用原生質體培養及融合，花葯培養或未成熟胚培養等組織培養的技術，在培養過程中選拔自然產生的體細胞變異體（somaclones），進行禾穀類作物品種改良，是目前生物技術研究與應用的發展方向。早期由懸浮細胞或癒合組織（callus）獲得大量的再生植株甚爲不易，致成爲應用上的主要瓶頸。雖經過去二十年來的努力，禾穀類作物已可經由不同的培植體（explant）及不同的培養方式得到再生植株，但其分化率仍偏低。自從 Green and Phillips（1975）利用玉米未成熟胚誘導癒合組織，獲得大量再生植株後，其它禾穀類作物的類似研究，相繼不斷。

欲獲得大量的再生植株，必須建立一套具有高分化能力的培養系統，其中基因型（genotype）、培植體、培養基組成及培養條件均爲重要因素。本試驗乃以玉米未成熟胚爲材料，探討影響癒合組織形成的諸因子，以爲日後實際進行誘變育種之需。

材料與方法

供試材料

本試驗所選用的材料代號分別爲2027－3－5×LY 22－4,（2027－3－5×LY 22－4）×（PM 9 DMR×AME Ⅲ），（OH43×OH45）×（D×C）, TA80－2598, U－67, U－31, H－236。其中（2027－3－5×LY 22－4）×（PM 9 DMR×AME Ⅲ）爲栽培雙交種台南11號，（OH43×OH45）×（D×C）爲栽培雙交種台南5號，TA80－2598爲栽培單交種台農351之母本，而U－67、U－31爲具有sugary－1突變基因的超甜玉米自交系，H－236爲美國進口超甜玉米雜交種。

田間栽培培

本試驗係1986年分春、秋二期作於台灣省農業試驗所試驗田進行，試驗小區行長5m，行株距80×25cm，每穴點播二粒種子，播種深度2～4cm，於四葉苗期（株高約15～30cm）間拔每穴留一株。全生育期每公頃三要素施用量爲 $N:P_2O_5:K_2O$＝200:90:60公斤。氮素60公斤及磷鉀肥全量於基肥時一次施用，另於播種後一個月及雄花抽穗前，分別再施氮素追肥及穗肥各70公斤。田間管理，包括中耕、除草、培土及灌溉等項目，均依照一般玉米栽培法進行。

方法

玉米未成熟胚培養誘導癒合組織形成的培養基爲 N_6（Chu et al. 1975）培養基的無機鹽類及MS（Murashige and Skoog 1962）培養基的有機成份，其中維他命 B_1（Thiamine・HCl）提高至4mg／l，外加500mg／l水解酪蛋白（casein hydrolysate）、1.38 g／l脯胺酸（L－proline）、3％蔗糖、0.8％瓊脂（phytagar）及3mg／l dicamba，簡稱MN－6培養基。田間母體植株於開花、吐絲期分別套袋，將人工自花授粉後十天的幼果穗取回，在無菌箱內除去苞葉，以0.5％次氯酸鈉震盪消毒20分鐘，經無菌水沖洗三次後，再以解剖刀取出未成熟胚以胚軸面接觸培養基方式接種，每支含10ml培養基之試管接種五個未成熟胚。接種之未成熟胚置於25±1°C的恆溫黑暗下培養，第四週後調查癒合組織形成率。各項試驗結果，以百分率表示，並依二項分佈計算95％之信賴介值（confidence limits of binomial variation），以比較各處理之差異性。

結　果

胚齡及基因型對玉米未成熟胚癒合組織形成之影響

胚齡及基因型對癒合組織形成具有顯著影響（表1）。一般而言，授粉後十天的未成熟胚較適宜癒合組織的誘導；超甜玉米的誘導率高達80～96％，而飼料玉米除2027－3－5

Table 1. Influence of embryo age and genotype on the callus induction from immature embryo culture in maize

Maize genotype	Number of embryo cultured	Number and percent of embryo forming callus						
		Age of embryo cultured (days after pollination)						
		10		12		14	16	18
		No.	%	No.	%	No.	No.	No.
2027-3-5 x LY 22-4	50	40	80(66-90)	2	4(0-14)	2	0	0
(2027-3-5 x LY 22-4) x (PH 9 DMR x AME III)	25	7	28(13-51)	0	0(0-14)	0	0	0
(OH 43 x OH 45) x (D x C)	45	3	7(1-20)	0	0(0-8)	0	0	0
TA80-2598	50	14	28(16-43)	0	0(0-7)	0	0	0
U-67	50	48	96(86-100)	12	24(13-38)	0	0	0
U-31	50	45	90(78-97)	13	26(15-41)	0	0	0
H-236	50	40	80(66-90)	20	40(27-55)	0	0	0

Immature embryos were cultured for four weeks. Data in parentheses are the 95% confidence limits.

×LY22－4可達80％之外，其餘基因型均低於30％，此一結果顯示癒合組織的誘導受基因型的影響很大。隨著胚齡的增加，癒合組織的誘導率明顯下降。以U－67自交系而言，授粉後12天的癒合組織的誘導率由96％降至24％，授粉14天後所有基因型均無癒合組織形成。

授粉後十天的未成熟胚長度約爲1mm，12天後約爲2mm，14天後約爲3mm，16天後約爲4mm，18天後約爲5mm大小。圖一顯示各時期胚齡間解剖形態上觀察，10天的未成熟胚，染色濃深，細胞小，分裂旺盛，細胞質濃稠，胚軸與胚根之間維管束連接，葉始原體包圍莖頂分生組織，胚齡12天的未成熟胚，葉始原體發育已明顯，隨著胚齡增加，葉始原體數目增加。授粉後16天的胚大多已分化完成，故不易形成癒合組織（表1）。

胚擺放角度對玉米未成熟胚癒合組織形成之影響

由表2得知，以子葉盤與培養基接觸，胚軸向上，癒合組織的誘導率均低於30％，且大多數培植體均發育成根狀組織。以胚軸接觸培養基的接種方式，除了（OH43×OH45）×（D×C）癒合組織低於10％之外，其餘基因型癒合組織誘導率均在28％以上。是故接種時胚擺放角度，以胚軸接觸培養基較有利於癒合組織誘導。

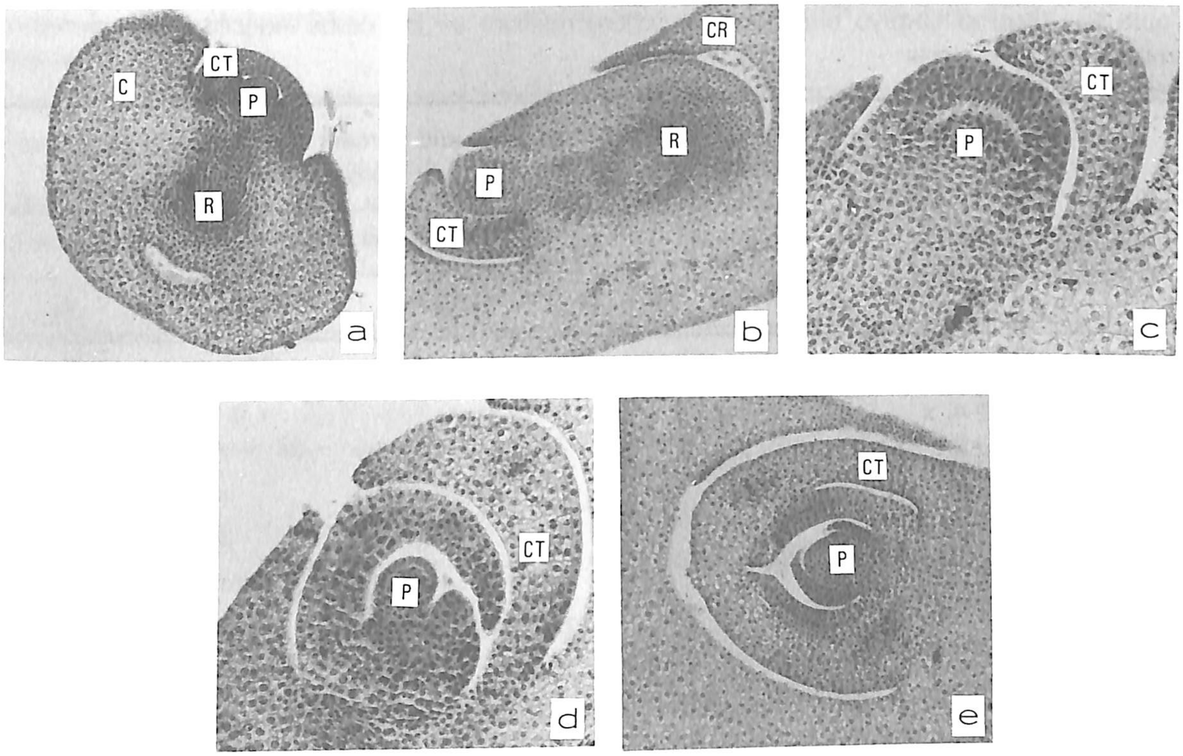

Fig. 1. Size and histological structure of immature embryos of maize inbred U-67. Immature embryos sampled at 10, 12, 14, 16 and 18 days after pollination (from a to e, respectively). C, cotyledon; CT, coleoptile; P, plumule; R, radicle; CR, coleorhiza. Magnification: a-b, 100 x; c-e, 200 x.

植物生長調節劑對玉米未成熟胚癒合組織形成之影響

培養基中auxin種類及濃度，對於癒合組織誘導的影響列於表3～6。3mg／1及5mg／1 dicamba（3,6－dichloroanisic acid）對癒合組織誘導效果較1mg／1爲佳。1mg／1 dicamba之培養基所培養之胚大多有根狀組織的產生，5mg／1 dicamba的培養基則抑制胚根的生長，大多形成癒合組織。品種間比較顯示2027－3－5－×LY22－4 於1mg／1 dicamba下仍有80％誘導率，而其他品種以3～5mg／1 dicamba較適宜誘導癒合組織。2, 4—D（2, 4-dichlorophenoxyacetic acid）的濃度則以1～2mg／1爲佳，0.5mg／1 2, 4－D之培養基未成熟胚多產生根狀組織， 幾乎無癒合組織形成。2,4,5－T（2,4,5－trichlorophenoxyacetic acid）對癒合組織誘導則以2mg／1爲佳。而不同濃度的NAA （α-naphthaleneacetic acid）對於癒合組織誘導效果均較差，只有U－31自交系在10mg／1 NAA下有50％誘導率。不同品種間癒合組織誘導率有極大差異，一般而言U－67、U－31及H－236等超甜玉米癒合組織誘導率較飼料玉米高出甚多。而U－31自交系對於auxin反應有明顯差異，在3mg／1 dicamba時，癒合組織誘導率爲90％，而在1mg／1

Table 2. Effect of embryo orientation on culture medium on the callus induction from immature embryo culture in maize

Maize genotype	Number of embryo cultured	Number and percent of embryo forming callus cultured at the position			
		Upward		Downward	
		No.	%	No.	%
2027-3-5 x LY 22-4	50	15	30(18-44)	40	80(66-90)
(2027-3-5 x LY 22-4) x (PH 9 DMR x AME III)	25	0	0(0-14)	7	28(13-51)
(OH 43 x OH 45) x (D x C)	45	4	9(2-22)	3	7(1-20)
TA80-2598	50	8	16(7-29)	14	28(16-43)
U-67	50	12	24(13-38)	48	96(86-100)
U-31	50	10	20(10-34)	45	90(78-97)
H-236	50	9	18(23-50)	40	80(66-90)

Immature embryos were cultured for four weeks. Downward position means that embryos were placed on the solid culture medium with the rounded scutellum side exposed and the flat plumule-radicle axis in contact with the medium. Upward position is the reverse of the downward position. Data in parentheses are the 95% confidence limits.

2, 4－D 時只有50％誘導率。或許，基因型與 auxin 種類及含量有交感作用。

蔗糖濃度對玉米未成熟胚癒合組織形成之影響

取 U－67 自交系授粉後十天的未成熟胚，接種於含3㎎／l dicamba 之 MN－6 培養基，發現在3、6及9％蔗糖濃度下所形成之癒合組織，質地緊密無差異。但是在12％蔗糖濃度下，則有助於培植體胚根、胚莖的發育，較不利於癒合組織形成（表7）。

氮素濃度對玉米未成熟胚癒合組織形成之影響

取 U－67自交系授粉後十天的未成熟胚，接種於含3㎎／l dicamba 及五種不同氮素濃度（1, 1／2, 1／4, 1／8及1／16X）之 MN－6基本培養基，結果發現在低氮素濃度（1／4, 1／8及1／16X）所形成之癒合組織，呈半透明狀，外形較黏稠，類似 non-embryogenic callus 之構造，隨著氮量的增加（1／2～1x）癒合組織形態及質地變得較爲緊密，且多呈 embrgogenic callus 之外觀，較有利於未來植株分化之誘導。

Table 3. Effect of dicamba concentration on the callus induction from immature embryo culture in maize

Maize genotype	Number of embryo cultured	Number and percent of embryo forming callus at dicamba concentration (mg/l) of					
		1		3		5	
		No.	%	No.	%	No.	%
2027-3-5 x LY 22-4	50	40	80(66-90)	40	80(66-90)	47	94(83-99)
(2027-3-5 x LY 22-4) x (PH 9 DMR x AME III)	25	0	0(0-14)	7	28(13-51)	8	32(16-55)
(OH 43 x OH 45) x (D x C)	45	3	7(1-20)	3	7(1-20)	18	40(27-57)
TA80-2598	50	2	4(0-14)	14	28(16-43)	35	70(56-82)
U-67	50	7	14(6-27)	48	96(86-100)	47	94(83-99)
U-31	50	7	14(6-27)	45	90(78-97)	19	38(25-53)
H-236	50	23	46(32-61)	40	80(66-90)	45	90(78-97)

Immature embryos were cultured for four weeks. Data in parentheses are 95% confidence limits.

Table 4. Effect of 2,4-D concentration on the callus induction from immature embryo culture in maize

Maize genotype	Number of embryo cultured	Number and percent of embryo forming callus at 2,4-D concentration (mg/l) of					
		0.5		1		2	
		No.	%	No.	%	No.	%
2027-3-5 x LY 22-4	50	0	0(0-7)	41	82(69-91)	47	94(83-99)
(2027-3-5 x LY 22-4) x (PH 9 DMR x AME III)	25	3	12(2-32)	4	16(45-83)	9	36(19-59)
(OH 43 x OH 45) x (D x C)	25	2	8(1-27)	12	48(29-71)	15	60(41-80)
TA80-2598	50	0	0(0-7)	18	36(23-50)	15	30(18-44)
U-67	50	0	0(0-7)	35	70(56-82)	32	64(50-77)
U-31	50	0	0(0-7)	28	56(41-70)	8	16(7-29)
H-236	50	2	4(0-14)	20	40(27-55)	37	74(59-85)

Immature embryos were cultured for four weeks. Data in parentheses are 95% confidence limits.

Table 5. Effect of 2,4,5-T concentration on the callus induction from immature embryo culture in maize

Maize genotype	Number of embryo cultured	Number and percent of embryo forming callus at 2,4,5-T concentration (mg/l) of					
		0.5		1		2	
		No.	%	No.	%	No.	%
2027-3-5 x LY 22-4	50	12	24(13-38)	31	62(47-75)	30	60(45-73)
(2027-3-5 x LY 22-4) x (PH 9 DMR x AME III)	25	0	0(0-14)	5	20(8-42)	6	24(10-47)
(OH 43 x OH 45) x (D x C)	25	3	12(2-32)	6	24(10-47)	13	52(33-74)
TA80-2598	50	0	0(0-7)	8	16(7-29)	9	18(9-31)
U-67	50	0	0(0-7)	31	62(47-75)	35	70(56-82)
U-31	50	0	0(0-7)	12	24(13-38)	10	20(10-34)
H-236	50	2	4(0-11)	20	40(27-55)	24	48(34-63)

Immature embryos were cultured for four weeks. Data in parentheses are 95% confidence limits.

Table 6. Effect of NAA concentration on the callus induction from immature embryo culture in maize

Maize genotype	Number of embryo cultured	Number and percent of embryo forming callus at NAA concentration (mg/l) of					
		5		10		15	
		No.	%	No.	%	No.	%
2027-3-5 x LY 22-4	50	4	8(2-19)	7	14(6-27)	3	6(1-17)
(2027-3-5 x LY 22-4) x (PH 9 DMR x AME III)	50	0	0(0-7)	0	0(0-7)	0	0(0-7)
(OH 43 x OH 45) x (D x C)	50	6	12(5-24)	6	12(5-24)	3	6(1-17)
TA80-2598	50	5	10(3-22)	2	4(0-14)	2	4(0-14)
U-67	50	7	14(6-27)	15	30(18-44)	2	4(0-14)
U-31	50	20	40(27-55)	25	50(36-64)	10	20(10-34)
H-236	50	2	4(0-14)	7	14(6-27)	5	10(3-22)

Immature embryos were cultured for four weeks. Data in parentheses are 95% confidence limits.

Table 7. Effect of sucrose concentration on the callus induction from immature embryo culture of maize inbred U-67

Concentration of sucrose %	Number of embryo cultured	Number and percent of embryo forming callus	
		No.	%
3	50	45	90(78-97)
6	50	42	84(71-93)
9	50	40	80(66-90)
12	50	0	0(0-7)

Immature embryos were cultured for four weeks. Basal medium is MN-6 medium supplemented with 3 mg/l dicamba. Data in parentheses are 95% confidence limits.

討　論

禾穀類作物未成熟胚培養誘導的癒合組織具有兩種不同形態，其中一種稱爲embryogenic callus，是指癒合組織在適當分化培養基中，可經由器官分化（organogenesis）或胚形成途徑（embryogenesis）再生成植株；而另一種 non－embryogenic callus 是由長管狀的細胞組成，不容易再生成植株。Nabors et al.（1983）報導玉米 embryogenic callus 植株再生率約爲 non－embryogenic callus 的33倍。因此，欲提高植株再生率，初期誘導 embryogenic callus 的形成極爲重要。

本試驗以玉米未成熟胚爲培植體，發現胚齡及胚擺放角度均可影響癒合組織的形成；授粉後10～18天的未成熟胚由切片觀查，10天的幼胚大約爲1mm 大小，分化尚未完全，所以容易形成癒合組織，而18天的胚已具有六片葉始原體（圖1－e），接種後容易發芽，因而無癒合組織形成。其他試驗報告指出水稻以授粉後10天（Lai and Liu 1982），大麥以授粉後10～13天（Dale and Deambrogio 1979），小麥以授粉後12～14天（Sears and Deckard 1982, Shimada and Yamada 1979）的未成熟胚所誘導癒合組織之植株再生能力最佳。雖 Green and Phillips（1975）曾報導玉米以授粉後18天的未成熟胚較適合癒合組織之的誘導及分化。但目前一般認爲1～2mm 大小的幼胚，較適宜癒合組織的誘導（Lu et al. 1983, Tomes and Smith 1985），與本試驗結果相符合。

胚擺放角度，則以授粉後10天的未成熟胚，接種於含3mg／1 dicamba 之 MN－6 基本培養基，以子葉盤朝上，胚軸與培養基接觸之接種方式，最有利於癒合組織的形成（表2）。Lai and Liu（1982）亦曾報導水稻未成熟胚培養，以授粉10天，子葉盤朝上的接種方式，能夠獲得較多的癒合組織。大麥（Dale and Deambrogio 1979）及玉

米（Green and Phillips 1975）也有類似結果報導。Vasil et al.（1983）以玉米未成熟胚之胚軸朝上，子葉盤與培養基接觸的接種方式，由掃描式電子顯微鏡觀查得知，於胚軸相當子葉節的部位會形成脊狀的組織，並進一步增殖形成緊密不透明的癒合組織；但胚軸並無癒合組織形成（Lu et al. 1982, Vasil et al. 1984）。推其原因，很可能因爲子葉盤靠近根鞘部位具有分裂旺盛細胞，較容易誘導癒合組織的緣故（Vasil et al. 1985）。但本研究卻發現胚軸朝上，子葉盤朝下的接種方式，癒合組織的誘導率均低於30%，而子葉盤朝上，胚軸與培養基接觸時，能夠獲得較多的癒合組織，此結果顯然與 Lai and Liu（1982）之發現較爲符合。

影響癒合組織形成的因子，除未成熟胚的胚齡及接種時擺放角度外，培養基的組成分亦是重要的因子。Barwale et al.（1986）認爲培養基的成份，可以決定大豆未成熟胚來源癒合組織之再生植株是經由器官分化或胚形成途徑。由於 embryogenic callus 能夠分化成植株的比例遠高於 non-embryogenic callus（Nabors et al. 1983）。因此，本試驗於培養基中加入不同生長調節劑（表3～6）、不同蔗糖濃度（表7）及氮量，期望獲得高度胚狀化的癒合組織。

雖然某些 auxin 類的植物生長調節劑具有誘導癒合組織形成的作用，但對禾穀類作物而言，其作用似乎不如雙子葉植物來得明顯。因此，禾穀類作物組織培養較雙子葉植物需較高濃度的 auxin（Wernicke and Brettell 1982）。大多數的報告均顯示2, 4－D 是誘導癒合組織最常使用的 auxin（Barwale et al. 1986, Boyes and Vasil 1984, Eapen and Rao 1982, Green and Phillips 1975, Lai and Liu 1982）。玉米方面其它型式的 auxin 如 PCA（Para-chlorphenoxyacetic acid）和2,4,5－T 也曾被使用（Beckert and Oing 1984, Heyser and Nabors 1982）。Duncan et al.（1985）報導以 dicamba 取代 2,4－D 不但可抑制胚發芽，亦顯著提高具有分化能力癒合組織的百分率。Gray and Conger（1985）報導20μM dicamba 可促進果園草（orchard grass）懸浮細胞的鮮重，並認爲 dicamba 和水解酪蛋白對體胚的發育是必需的。Lai and Liu（1982）報導10^{-5}M或10^{-6}M NAA，可促進水稻幼芽和根的生長，且只有少數的未成熟胚能形成癒合組織，增加 NAA 的量至10^{-4}M 可提高癒合組織的形成率。本試驗比較2,4－D, 2,4,5－T, NAA 及 dicamba 對癒合組織誘導之影響，以 U－67 自交系而言，3mg／l dicamba 處理，癒合組織誘導率高達96%（表3），較2, 4—D, 2,4,5－T 及 NAA 的處理佳。Craffts（1964）曾指出帶氯基的苯環酸（chlorobenzoic acid），如 dicamba 較不易被植物體代謝或改變，而帶氯基的酚酸類（chlorophenoxy acid）如2, 4－D, 2,4,5－T 則易改變活性。是否由於 dicamba 較穩定，可維持活性較久，因而提高癒合組織誘導率，或是其它因素影響仍有待進一步研究。

蔗糖在培養基中主要功能爲提供培植體能量的來源及調節滲透壓，通常用量約爲2～3%。玉米未成熟胚培養則以0.5mg／l 2,4－D 濃度下，較適合 embryogenic callus 形

成（Lu et al. 1982）。在相同2,4-D 濃度下，12%蔗糖較3%蔗糖可提高癒合組織的誘導率，且能抑制胚的發芽（Lu et al. 1983）。以水稻花藥、高粱未成熟花序、小米未成熟胚及成熟種子等爲培植體，癒合組織的誘導均以稍高濃度的蔗糖（4%～5%）效果較佳（Genovesi and Magill 1982, Brettell et al. 1980, Heyser and Nabors 1982）。Lu et al.（1983）認爲 MS 培養基中加入不同濃度的2, 4－D（0.25-2㎎／1），對玉米未成熟胚誘導 embryogenic callus 影響較小，而不同蔗糖濃度對 embryogenic callus 形成的影響較大，高濃度蔗糖（6%～12%）可明顯促進 embryogenic callus 的形成。而本試驗結果卻顯示蔗糖濃度（3%～9%）對超甜玉米 U－67自交系癒合組織的形成無顯著影響，12%之蔗糖明顯不利於癒合組織之形成（表7），其原因待進一步研究。

以未成熟胚爲培植體誘導出的癒合組織通常具有較高的分化能力（Duncan et al. 1985, Lu and Vasil 1982），而成熟培植體所誘導的癒合組織通常只能發育成類似根始原體的組織，因而限制了進一步分化的能力（Cure and Mott 1978）。Vasil et al.（1983）以玉米未成熟胚培養於含2%蔗糖濃度培養基，則子葉盤靠近根鞘附近的細胞，迅速增殖形成空腔，表皮細胞向外增生形成球形胚，或是形成柔軟、鬆散且易脆的 embryogenic callus；而培養於6%蔗糖濃度的培養基時，則靠近原始形成層部位的細胞最先開始分裂，通常在子葉節或子葉盤基部有明顯分生組織，特別是子葉盤靠近根鞘部位的細胞分裂最旺盛，可行成緊密的 embryogenic callus，而且能發育成組織良好的體胚。Ozias-Akins and Vasil（1982）以小麥未成熟胚爲材料，研究培養初期癒合期組織的形成及莖的再生，首先觀察到二種型態的癒合組織，一種爲較鬆散易碎（friable）的癒合組織，通常只有根的分化；另一種癒合組織結構較緊密（compact），外觀上不透明，會形成根、莖組織。Vasil et al.（1984）報導玉米未成熟胚子葉盤誘導的癒合組織呈白色、不透明緊密狀，經長期繼代培養後變得疏鬆失去緊密特性，但仍具有分化能力。事實上，由子葉盤產生的緊密、不透明的癒合組織發育而成的體胚，與經長期繼代培養之後形成的體胚是相類似的，均具有獨立的維管束系統（Vasil et al. 1984, 1985）。

誘導癒合組織形成擬胚體受到許多因素所控制，其中還原態氮（reducing nitrogen）的含量可能是重要因子之一。Halperin and Wetherell（1965）首先提出銨鹽（ammonium）可能是決定胡蘿蔔懸浮細胞分化過程的因子。Wetherell and Dougall（1976）則報導胡蘿蔔懸浮細胞培養，以 KNO_3爲單一氮源，只有少數體胚形成，若加入0.1mM NH_4Cl時，體胚形成數目明顯增加。本試驗採用含有硝酸鹽（KNO_3）及銨鹽（$(NH_4)_2SO_4$）的 MN－6爲基本培養基誘導癒合組織的形成，並探討不同氮素濃度對癒合組織形成的影響。當氮素濃度減爲基本培養基的1／16時，所誘導的癒合組織，外形較黏稠、呈半透明狀，而氮素濃度增加時，癒合組織的形態及質地較爲緊密，且質地緊密的癒合組織大都具有組織結構完整的體胚，因而推測硝酸鹽及銨鹽的比例或濃度，很可能是影響體胚形成的重要因素之一。

誌謝：本研究承國科會經費補助（NSC78－0409－B055－02），農試所玉米研究室提供試驗材料，文稿承中興大學農藝系朱德民教授及農試所農藝系劉大江博士斧正，特此致謝。

引用文獻

Barwale, U. B., Kerr, M. R. and Widholm, J. M. (1986) Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. *Planta* 167:473-481.

Beckert, M. and Qing, C. M. (1984) Result of diallel trial and a breeding experiment for *in vitro* aptitude in maize. *Theor. Appl. Genet.* 68:247-251.

Boyes, C. J. and Vasil, I. K. (1984) Plant regeneration by somatic embryogenesis from cultured young inflorescenses of *Sorghum arundinaceum* (Desv.) Stapf. Var. sudanense (Sudan grass). *Plant Sci. Lett.* 35:153-157.

Brettell, R. I. S., Wernicke, W. and Thomas, E. (1980) Embryogenesis from cultured immature inflorescences of *Sorghum bicolor. Protoplasma* 104:141-148.

Chu, C. C., Wang, C. C., Sun, C. S., Chen, H. Yin, K. C., Chu, C. Y. and Bi, F. Y. (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sinica* 17:657-668.

Crafts, A. S. (1964) Herbicide behavier in the plant. In: The Physiology and Biochemistry of Herbicides. (ed. by Audus, L. J.) pp. 75-110. Academic Press, New York.

Cure, W. W. and Mott, R. L. (1978) A comparative anatomical study of organogenesis in cultured tissue of maize, wheat and oats. *Physiol. Plant.* 42:91-96.

Dale, P. J. and Deambrogio, E. (1979) A comparison of callus induction and plant regeneration from different explants of *Hordeum vulgare. Z. Pflanzenphysiol.* 94:65-77.

Duncan, D. R., Williams, M. E., Zehr, B. E. and Widholm, J. M. (1985) The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous *Zea mays* genotypes. *Planta* 165:322-332.

Eapen, S. and Rao, P. S. (1982) Callus induction and plant regeneration from immature embryos of rye and triticale. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 1:221-227.

Genovesi, A. D. and Magill, C. W. (1982) Embryogenesis in callus derived from rice microspores. *Plant Cell Rep.* 1:257-260.

Gray, D. J. and Conger, B. V. (1985) Influence of dicamba and casein hydrolysate on somatic embryo number and culture quality in cell suspensions of *Dactylis glomerata* (Gramineae). *Plant Cell Tissue Organ Culture* 4:123-133.

Green, C. E. and Phillips, R. L. (1975) Plant regeneration from tissue culture of maize. *Crop Sci.* 15:417-421.

Halperin, W. and D. F. Wetherell. (1965) Ammonium requirement for embryogenesis *in vitro*. *Nature* 30:519-520.

Heyser, J. W. and Nabors, M. W. (1982) Regeneration of proso millet embryogenic calli derived from various plant parts. *Crop Sci.* 22:1070-1074.

Lai, K. L. and Liu, L. F. (1982) Induction and plant regeneration of callus from immature embryos of rice plant (*Oryza sativa* L.). *Japanese J. Crop Sci.* 51:70-74.

Lu, C. and Vasil, I. K. (1982) Somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of *Panicum maximum* Jacq. *Am. J. Bot.* 69:77-81.

Lu, C., Vasil, I. K. and Ozias-Akins, P. (1982) Somatic embryogenesis in *Zea mays* L. *Theor. Appl. Genet.* 62:109-112.

Lu, C., Vasil, V. and Vasil, I. K. (1983) Improved efficiency of somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of maize (*Zea mays* L.). *Theor. Appl. Genet.* 66:285-289.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-497.

Nabors, M. W., Heyser, J. W., Dykes, T. A. and Demott, K. J. (1983) Long-duration, high-frequency plant regeneration from cereal tissue cultures. *Planta* 157:385-391.

Ozias-Akins, P. and Vasil, I. K. (1982) Plant regeneration from culture immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum* L. (wheat): Evidence for somatic embryogenesis. *Protoplasma* 110:95-105.

Sears, R. G. and Deckard, E. L. 1982. Tissue culture variability in wheat: callus induction and plant regeneration. *Crop Sci.* 22:546-550.

Shimada, T. and Yamada, Y. (1979) Wheat plants regenerated from embryo cell cultures. *Japanese. J. Gene.* 54:379-385.

Tomes, D. T. and Smith, O. S. (1985) The effect of parental genotype on initiation of embryogenic callus from elite maize (*Zea mays* L.) germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 70:505-509.

Vasil, V., Lu, C. and Vasill, I. K. (1983) Proliferation and plant regeneration from the nodal region of *Zea mays* L. (maize, graminaea) embryos. *Am. J. Bot.* 70:951-954.

Vasil, V., Vasil, I. K. and Lu, C. (1984) Somatic embryogenesis in long-term callus cultures of *Zea mays* L. (gramineae). *Am. J. Bot.* 71:158-161.

Vasil, V., Lu, C. and Vasil, I. K. (1985) Histology of somatic embryogenesis in cultured immature embryos of maize (*Zea mays* L.) *Protoplasma* 127:1-8.

Wernicke, W. and Brettell, R. I. S. (1982) Morphogenesis from cultured leaf tissue of *Sorghum bicolor* culture initiation. *Protoplasma* 111:19-27.

Wetherell, D. F. and Dougall, D. K. (1986) Sources of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild carrot tissue. *Physiol. Plant.* 37:97-103.

（收稿日期：79年12月6日，接受刊登日期：80年1月14日）